

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日

2003年10月23日 (23.10.2003)

(10)国際公開番号

WO 03/087163 A1

(51)国際特許分類<sup>7</sup>:

C07K 16/46, C12N 15/09

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21)国際出願番号:

PCT/JP03/04773

(22)国際出願日:

2003年4月15日 (15.04.2003)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(84)指定国(広域): ARIPO特許(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30)優先権データ:

特願2002-112369 2002年4月15日 (15.04.2002) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 小嶋 哲郎 (KOJIMA,Tetsuo) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74)代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).



A1

WO 03/087163

(54)Title: METHOD OF CONSTRUCTING scDb LIBRARY

(54)発明の名称: scDbライブラリーの作成方法

(57)Abstract: By disposing restriction enzymic sites appropriately for antigen-encoding regions, a bispecific Db library can be efficiently and collectively constructed from an scFv library without resort to any troublesome procedures.

(57)要約: 制限酵素部位を抗原コード領域に対して適切に配置することにより、二特異性Dbライブラリーを効率的に、煩雑な操作を用いずにscFvライブラリーより一括処理により構築することが可能となった。

- 1 -

## 明細書

### s c D b ライブライマーの作成方法

#### 技術分野

本発明は、単鎖ダイアボディ(single chain diabody; scDb)ライブラリー及びその作成方法に関する。また、本発明は該単鎖ダイアボディライブラリーを構成する遺伝子、及び、該遺伝子を含む発現ベクター、並びに、それらの作成方法に關し、さらに、該遺伝子によりコードされるペプチドに関する。

#### 背景技術

異なる抗原に結合することができる多特異性抗体(例えば、二特異性抗体(BsA b))は免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。多特異性抗体は、例えば、酵素免疫分析で用いられる酵素を固定化する際に利用することができる。即ち、多特異性抗体の一方の腕を酵素上の酵素反応を阻害しない部分のエピトープと結合するように、そしてもう一方の腕は固定化する担体上に対して結合するように設計し、担体上に酵素を抗体を介して結合する(例えば、Hammerling et al., J.Exp.Med. 128: 1461-1473 (1968))。また、多特異性抗体を癌等の様々な疾病的免疫診断において利用する方法も報告されている(Songsivilai et al., Clin.Exp.Immunol. 79: 315 (1990))。癌の診断において使用される二特異性抗体は、例えば、抗体の一方の腕が腫瘍関連抗原を認識するよう設計され、他方は検出可能なマーカーに結合するよう設計される(例えば、Le Doussal et al., Int.J.Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992); Le Doussal et al., J. Nucl.Med. 34: 1662-1671 (1993); Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650-6655 (1991))。

さらに、病原体または腫瘍細胞に対する患者の細胞性免疫応答の誘発において

- 2 -

多特異性抗体を利用する方法も知られている(Segal et al., *Chem. Immunol.* 47: 179 (1989); Segal et al., *Biologic Therapy of Cancer* 2(4) De Vita et al. eds., J.B.Lippincott, Philadelphia (1992) p.1; Hseih-Ma et al., *Cancer Res.* 52: 6832-6839 (1992); Weiner et al., *Cancer Res.* 53: 94-100 (1993))。

また、多特異性抗体はT細胞の細胞を殺す作用を誘起するように設計することもできる(Shalaby et al., *J.Exp.Med.* 175(1): 217 (1992); de Lisi et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991)p.249; Clark et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds. Lienhart (1991)p.243; Kroesen et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 37: 400-407 (!993); Kroesen et al., *Br.J.Cancer* 70: 652-661 (1994); Weiner et al., *J.Immunol.* 152: 2385 (1994))。その他、多特異性抗体は、纖維素溶解剤またはワクチンのアジュバントとしても利用し得るし、感染性の疾患(例えば、HIV、インフルエンザ、原生虫等に感染した細胞を標的として)の治療用、腫瘍細胞へ抗毒素の運搬、及び、細胞表面受容体へ免疫複合体を作用させるためにも利用することができる(Fanger et al.、上述)。

従来、多特異性抗体は、(1)異なる特異性を有する抗体の異種二機能性リンカーによる化学的カップリング(Paulus, Behring Inst.Mitt., 78:118-132 (1985))、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞の融合 (Millstein and Cuello, *Nature* 305: 537-539 (1983))、及び(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種類の遺伝子)のマウス骨髄腫細胞または他の真核細胞発現系へのトランسفエクションとそれに続く二特異性の一価部分の単離(Zimmermann, *Rev.Physio.Biochem.Pharmacol.* 105: 176-260 (1986); Van Dijk et al., *Int.J.Cancer* 43: 944-949 (1989))等の方法により製造してきた。

ダイアボディ(Db)は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片である(P.Holliger et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90: 6444-6448 (1993)、EP

- 3 -

404,097 号、W093/11161 号等)。ダイアボディは、2 本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5 残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされる VL と VH とは、その間のリンカーが短いため単鎖 V 領域フラグメント(scFv)を形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは 2 つの抗原結合部位を有することとなる。このとき 2 つの異なる抗原(a、b)に対する VL と VH を VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub> と VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> の組合せで 5 残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二特異性 Db として分泌される。二特異性 Db は多特異性抗体の一種である。

#### 発明の開示

二特異性 Db においては、2 種類の鎖の汲み合わせは 3 通りあるため、得られる二特異性 Db は全体の 50% に留まる。一方、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗原との反応性により特定の遺伝子を選択するためには、抗原結合部位を scFv として提示させるために VH と VL を 15 残基程度のリンカーで結合して発現させる必要がある。このように抗原との結合性により選択されたファージ抗体ライブラリー由来の scFv の VH と VL を二特異性 scDb として発現させるためには、リンカーの長さを scFv の発現に必要とされる 15 残基程度のものから、Db の発現を可能にする 5 残基程度の長さのリンカーに換えるための PCR アセンブル等の煩雑な操作が必要となり、一括処理することは困難であった。

本発明により、新規な二特異性 scDb ライブラリーの構築法が提供される。本発明においては、二特異性 Db を確実に生産できるよう、2 つの異なる抗原(a、b)に対する VL と VH を VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>-VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> の順に、VH<sub>b</sub> と VL<sub>b</sub> の間は 15 残基以上のリンカーで結んだ単鎖として発現させる(但し、本発明は VL<sub>a</sub>、VH<sub>a</sub>、VL<sub>b</sub>、VH<sub>b</sub> 等の可変領域の順序で限定されるものではない)。本発明では、このようなポリペプチド鎖(VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>-VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub>)を発現する二特異性 scDb ライブラリーを scFv のファ

- 4 -

ージライブラリーから一括処理により作成することができる。即ち、2つの抗体可変領域(VLa と VH<sub>a</sub>)をコードするヌクレオチドが制限酵素切斷部位を有するリンカーで結ばれた遺伝子、及び、2つの抗体可変領域(VLb と VH<sub>b</sub>)をコードするヌクレオチドが長いリンカーにより結ばれ、可変領域をコードするヌクレオチドのリンカーと結合されていない側に制限酵素切斷部位を有する遺伝子を用い、これらを制限酵素で処理した後、VLa と VH<sub>a</sub> の間に VLb 及び VH<sub>b</sub> が挟まれるように結合させる。本発明は、このような二特異性 scDb ライブラリーの構築法に加え、該方法に用い得る遺伝子、該方法により得られる遺伝子、これらの遺伝子を含む発現ベクターまたは抗体ライブラリー、及び、該遺伝子によりコードされるペプチドを提供する。

また、本発明では、抗原との結合で選択された scFv の VH と VL を二特異性 scDb として一括処理で発現させる方法として、ファージ抗体ライブラリーからパンニング等によって濃縮した抗体クローニングを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提案する。より詳細には、本発明は、

- (1) 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切斷部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、
- (2) リンカーに制限酵素切斷部位が2つ以上存在することを特徴とする(1)記載の遺伝子、
- (3) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である(1)または(2)記載の遺伝子、
- (4) 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする  
(1)～(3)いずれか記載の遺伝子、
- (5) 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切斷部位を付加した遺伝子、
- (6) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である(5)記載の遺伝子、

- 5 -

(7) 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(5)または(6)記載の遺伝子、

(8) 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子、

(9) 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間が短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(8)記載の遺伝子、

(10) 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である(8)または(9)記載の遺伝子、

(11) 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる(10)記載の遺伝子、

(12) 以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアボディーをコードする遺伝子の作成方法

(a) (1)～(4)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(b) (5)～(7)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、

を含む方法、

(13) (1)～(11)いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド、

(14) (1)～(11)のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー、

(15) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

(a)第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

- 6 -

(b) 第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、

それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在  
している抗体ファージライブラリーを作成する工程、

(c)(a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリー  
から調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(d) 上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、  
第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対  
する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工  
程、

(16) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法

(a) (1)～(4) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(b) (5)～(7) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入す

(17) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

(a) 抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以  
上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成  
する工程、

(b) 上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可  
変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c) 上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることに  
より、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程、並びに

(18) (1)～(11) いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクター  
に関する。

本発明の方法は、二特異性 scDb のみならず一特異性 scDb (例えば、同じエピ  
トープを認識するが配列の異なる可変領域を有する scDb など) のスクリーニング

にも応用できる。

本発明の scDb ライブライマーの作成方法においては、例えば、まず図 1 に示すように、抗原 A を免疫した動物の脾臓等から VL-VH の順につないだ抗体ファージライブライマーを構築する。抗体ファージライブライマーは、公知の方法に従って構築することができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Jackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J.Mol.Biol. 222: 582-597 (1991)等参照)。

動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原(ハプテンを含む)が挙げられる。蛋白質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質等からなる物質が抗原として挙げられ、本発明において、特に抗原を構成する物質の種類は限定されない。動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片(例えば、受容体の細胞外領域)を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然(腫瘍セルライン等)由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であり得る。

二特異性 Db は、従来知られている二特異性抗体と同様に使用することができるものである。そこで癌の治療を目的として、例えば、一方の腕を腫瘍細胞抗原を認識するようにし、他方が細胞傷害性を誘起する分子を認識するように設計することができる。この場合、腫瘍細胞抗原としては例えば CD15、p185<sup>HER2</sup>、1D10(悪性 B 細胞)、p97、腎細胞癌、OVCAR-3、L-D1(大腸癌)、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、EGF 受容体、CAMA1、MoV18、CD19、神経細胞接着分子(neural cell adhesion molecule; NCAM)、葉酸結合蛋白質(FBP)、AMOC-31 (pan carcinoma associated antigen)、Id-1、CD22、CD7、CD38、CEA を選択することができる。また、細胞傷害性を誘起する分子としては、Fc $\gamma$ RI、CD16、CD3 等を挙げることができる。

- 8 -

る。また、上述の細胞障害性を誘起する分子に代えて、例えば、サポニン、リシンのA鎖、IFN- $\alpha$ 、ピンカアルカリオイド等の毒素と結合するようにDbを設計することもできる。このような二特異性Dbは癌の治療において特に有用である。

又、二特異性Dbはアゴニスト抗体としても有用である。例えば、多くのサイトカイン受容体ではホモ又はヘテロ二量体を形成しており、リガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝えるようになると考えられている。従って、このような二量体を形成する受容体に結合する二特異性Dbは、リガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニストDbとなり得る。

その他の二特異性Dbとしては、(1)CD30及びアルカリホスファターゼに結合し、その結果、リン酸マイトマイシンをマイトマイシンアルコールに変換するDb等、物質の変換を助ける酵素を伴うもの、(2)纖維素溶解剤として用い得る、フィブリン、tPA、uPA等に結合するDb、(3)LDL及びFc受容体(Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIまたはFc $\gamma$ RIII)等に結合し免疫複合体を細胞表面受容体へ誘導するDb、(4)CD3等のT細胞上の抗原と、HCV、インフルエンザ、HIV等の病原菌の抗原を認識する感染性の疾患に用い得るDb、(5)腫瘍の検出に用い得る腫瘍抗原と、EOTUBE、DPTA、ハプロテン等の検出可能な物質に結合性を有するDb、(6)ワクチンアジュバントとして用い得るDb(Fanger et al., Crit.Rev.Immunol. 12: 101-124 (1992)参照)、並びに(7)診断において使用し得るウサギ IgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、FITC、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の検出可能な物質と、ホルモン、フェリチン、ソマトスタチン、サブスタンスP、CEA等を抗原とするDbが挙げられる。しかしながら、本発明のDbはこれらに限定されるものではない。

次に抗原を用いて適当な哺乳動物を免疫する。例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等の動物を免疫化に使用することができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法(例えば、抗体重

- 9 -

鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法)により単離する。

本発明における、H鎖及びL鎖可変領域とは、免疫グロブリンのH鎖及びL鎖のうち、N末端から通常約110残基のアミノ酸からなる部分を指す。免疫グロブリンは、異なるクラス(IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM)に分類され、さらにこれらは幾つかのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG-1、IgG2、IgG-3、及びIgG-4、並びにIgA-1、及びIgA-2等)に分類されるが、本発明のH鎖及びL鎖可変領域は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属するものであってもよく、特に限定されない。

さらに、本発明の抗体可変領域は所望の抗原との結合性を有している限り、より短いまたは改変された抗体断片であってもよい。「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位とを含むものである。この領域は1つのH鎖及びL鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。各可変領域中に存在する3つの相補性決定領域(超可変部;CDR)が相互作用し、ダイマーの表面上に抗原結合部位を形成している。即ち、H鎖とL鎖をあわせて6つのCDRが抗体の抗原結合部位として機能している。しかしながら、1つの可変領域であっても全結合部位を含む場合よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し、結合する能力を有していることが知られている。従って、本発明におけるDbを構成する抗体可変領域は、Fv断片が特に好ましいが、これに限定されるものではなく、H鎖またはL鎖のCDRが保存され抗原を認識し、結合する能力を有する領域であればよい。

また、遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)由来のモノクローナル抗体のCDR以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組構造配列に置き換え「ヒト化抗体」とする技術が公知である(例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta Curr.Op.Struct.Biol. 2: 593-596 (1992)参照)。ヒト化抗体は、

- 10 -

レシピエント抗体に導入させた CDR または枠組構造配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の可変領域はヒト化等の改変された可変領域も包含する。

その他の可変領域を、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変することもできる。このような改変は、部位特異的変異(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985)参照)、PCR 変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上(例えば 95%以上)のアミノ酸配列相同性・類似性を元となった抗体 H鎖または L鎖の可変領域のアミノ酸配列と有する。本明細書において、配列の相同性・類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となつた抗体残基と相同(同じ残基)または類似(一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基づき同じグループに分類されるアミノ酸残基)するアミノ酸残基の割合として定義される。

通常、天然のアミノ酸残基は(1)疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2)中性親水性：システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン及びグルタミン、(3)酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸、(4)塩基性：ヒスチジン、リシン及びアルギニン、(5)鎖の配向に影響する残基：グリシン及びプロリン、並びに(6)芳香族性：トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンのグループに各々のアミノ酸の側鎖の性質に基づき分類される。

続いて、単離した重鎖及び軽鎖の DNA を間に 20 残基程度の長さのリンカーを用い結合し、適當なファージベクターに組込み、ファージライブラリーを作成する。このとき、リンカーの中に、例えば制限酵素 BamHI、AccIII 等の認識配列を配しておく。このようなリンカーとしては、例えば以下のような配列を有するものを例示することができる：

- 11 -

BamHI

AccIII

GGTGGTGGTGGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGTGGTCT(配列番号: 1)

CCACCAACCACCTAGGCCACCACCAAGACCGCCGCCGCCAGGCCCTCACCAAGA

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer(配列番号: 2)

その他、本発明において使用し得る制限酵素認識配列としては、例えば BamHI、 AccIII、 AluI、 EcoRI、 HincII、 HindIII、 Hinfl、 NotI、 SacI、 SalI、 Sau3AI、 Smal、 TaqI、 XbaI、 AatI、 BclI、 BstEII、 EheI、 KpnI、 NheI、 PstI、 PvuII、 SfiI、 BglII、 HaeIII、 HhaI、 HpaII、 XhoI 等が挙げられる。

また、ファージライブリーアーを構成するファージとしては、G4 ファージ、 M13 ファージ、 fd ファージ、 f1 ファージ、 λ ファージ、 T4 ファージ、 T7 ファージ、 P1 ファージ、 MS2 ファージ、 ΦK ファージ、 ΦX174 ファージ、 λgWES、 λB、 Charon 4A、 Charon30 等を例示することができる。

同様にして抗原 A とは異なる抗原、または同じ抗原(例えば、エピトープが異なる場合など)により動物またはリンパ球を免疫化し、抗体の重鎖または軽鎖をコードする DNA を単離し、20 残基程度の長さのリンカーを用い VH-VL の順につないだ抗体ファージライブリーアーを構築する。このとき、抗原 A に結合する VL<sub>a</sub> と VL<sub>b</sub> とをコードする遺伝子の間に、抗原 B に結合する VH<sub>b</sub> 及び VL<sub>b</sub> をコードする遺伝子を挿入することができるよう VH<sub>b</sub> の 5' 末端、及び VL<sub>b</sub> の 3' 末端に制限酵素により認識される配列を設ける。即ち、抗原 A についてのライブリーを制限酵素 BamHI、 AccIII 等の認識配列を配して作成した場合には、 VH の 5' 末端には BamHI を、 VL の 3' 末端には AccIII を配しておく。

次に、上記ファージライブリーアー又は該ファージライブリーアーから調製された可変領域を含む遺伝子(例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブリーアーのファージミド(例えば、 Vaughan et al., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996) 参照)あるいは上記ファージライブリーアーから PCR を用いて増幅した遺伝子など)を、リンカー並びに VL 及び VH をコードする遺伝子の末端に配置した制限酵素、例えば上記 BamHI と AccIII の認識部位を含むリンカーを用いた場合には、

- 12 -

BamHI と AccIII で処理する。得られた抗原 B に対する抗体の VH-VL 断片をコードする遺伝子を抗原 A に対する抗体ファージミドの BamHI と AccIII の間に挿入する。これによって抗 A 抗体と抗 B 抗体の様々な組み合わせの discDb のライブラリーが構築できる。

本発明において、「リンカー」は、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されず、制限酵素切断部位を有していても、有していないてもよい。ここで、「長いリンカー」とは、抗体の H鎖可変領域と L 鎖可変領域を該リンカーを結んでファージライブラリー上に発現させた場合に、scFv として提示される長さのリンカーのことを意味する。その鎖長は特に制限されないが、好ましくは 30~150bp の鎖長を有し、さらに好ましくは 36~90bp の鎖長を有し、特に好ましくは 45~60bp の鎖長を有する。また、「短いリンカー」とは、抗体の H 鎖可変領域と L 鎖可変領域を該リンカーで結んで発現させた場合に、二量体(diabody:Db)を形成するリンカーのことを意味し、その鎖長は特に制限されないが、好ましくは 6~27bp の鎖長を有し、さらに好ましくは 9~21bp の鎖長を有し、特に好ましくは 12~18bp の鎖長を有する。

さらに、VLa 及び VHa をコードする遺伝子のリンカーとは逆側の部分にも適当な制限酵素認識部位を設けておくことにより VLa-VHb-VLb-VHa をコードする断片を切出し、適当な発現ベクターへ挿入し、発現させ、その生物活性を指標に目的とする Db をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。例えば、上述のように抗原 A 及び抗原 B に対するファージ抗体ライブラリーにおいて BamHI 及び AccIII を用いている場合には、図 1 において示すように SfiI 等の別の制限酵素を用いて適当な発現ベクターに挿入することが出来る。指標とする生物活性としては、例えば、抗原と特異的に結合する活性が挙げられ、抗原の種類によっては阻害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性等も挙げられる。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築した biscDb ライブラリーについては、レトロウイルスベクター等のベクターに挿入し、目的サイトカイ

- 13 -

ン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニスト biDb を選択することができる。

本発明の Db を発現させるための発現系を構築するための手順および宿主に適合した組換えベクターの構築は遺伝子工学の分野において慣用の技術を用いて行うことができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1989)等参照)。宿主細胞としては、細菌等の原核生物、並びに、酵母、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞等の真核細胞等、本発明の Db を発現できる細胞であればいずれも用いることができる。特に、グリコシリ化の点から考えると哺乳動物細胞が好ましい。

発現ベクターは、遺伝情報の転写及び翻訳を制御するプロモーター、ターミネーター等のユニットを含む必要がある。例えば、大腸菌等のエシエリシア属の微生物を宿主細胞とする場合、プラスミドベクターとして pBR、pUC 系プラスミドを利用でき lac、trp、tac、trc、入ファージ PL、PR 等に由来するプロモーターが利用可能である。また、ターミネーターとしては trpA 由来、ファージ由来、rrnB リボソーマル RNA 由来のものを用いることができる。枯草菌等のバチルス属の微生物を宿主とする場合については、pUB110 系、pC194 系等のプラスミドが知られており、場合により遺伝子を染色体にインテグレートすることもできる。プロモーター・ターミネーターとして apr、npr、amy 等由来のものが利用できる。その他、原核細胞としてはショードモナス属(例えば、*Pseudomonas putida*, *P. cepacia* 等; pKT240 等のベクター)、ブレビバクテリウム属(例えば、*Brevibacterium lactofermentum*; pAJ43 等)、コリネバクテリウム属(例えば、*Corynebacterium glutamicum* 等; pCS11、pCB101 等)、ストレプトコッカス属(pHV1301、pGK1 等)、ラクトバチルス属(pAMβ1 等)、ロドコッカス属(*Rhodococcus rhodochrous* 等より単離されたプラスミド(J.Gen.Microbiol. 138: 1003 (1992))等)、ストレプトマイセス属(例えば、*Streptomyces lividans*, *S. virginiae* 等; pIJ486、pKC 1064、pUWL-KS 等)、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレビシエラ属、ブ

- 14 -

ロテウス属、サルモネラ属(*Salmonella typhimurium*等)、セラチア属(*Serratia marcescans*)、シゲレラ属に属する微生物が挙げられる。

真核微生物の発現系としては、*Saccharomyces cerevisiae* を宿主とし、YRp 系、YE<sub>p</sub> 系、YC<sub>p</sub> 系、YI<sub>p</sub> 系のプラスミドを用いた系が知られている。また、ADH、GAP DH、PHO、GAL、PGK、ENO 等のプロモーター・ターミネーターが利用可能である。その他、クライペロマイセス属(例えば、*Kluyveromyces lactis* 等; 2μm 系、pKD1 系、pGKI1 系、KARS 系等のプラスミド)、シゾサッカロマイセス属(例えば、*Schizosaccharomyces pombe* 等； pAUR224 等)、チゴサッカロマイセス属(例えば、*Zygosaccharomyces rouxii* 等； pSB3、及び、*S.cerevisiae* 由来 PH05 プロモーター等)、ハンゼヌラ属(例えば、*Hansenula polymorpha* 等)、ピキア属(例えば、*Pichia pastoris* 等)、カンディダ属(例えば、*Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida albicans* 等)、アスペルギルス属(例えば、*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 等)、及びトリコデルマ属(例えば、*Trichoderma reesei* 等)等を本発明の発現ベクター系において用いることができる。

その他、植物細胞を宿主として用いることもできる。例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズ、ペチュニア、及びタバコ等由來の植物細胞を宿主とすることができます。特に良く知られた系として *Nicotina tabacum* 由來の細胞を用いたものが知られており、これをカルス培養すればよい。植物を形質転換する際には、例えば、pMON530 等の発現ベクターを用い、該ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* 等の細菌に導入する。この細菌をタバコ(例えば、*Nicotina tabacum*)に感染させると、所望のポリペプチドをタバコの葉等から得ることができる。

カイコ(*Bombyx mori*)、カ(*Aede aegypti*, *Aedes albopictus*)、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)等の昆虫細胞を宿主として用いることも可能である。例えば、カイコを用いる場合、Db をコードする DNA をバキュロウイルスベクター等に挿入し、該ウイルスをカイコに感染させることによりカイコの体液から目的

- 15 -

のポリペプチドを得ることができる(Nature 315: 592-594 (1985))。

動物細胞を宿主として用いる場合には、例えば、pME18S(Med. immunol. 20: 27-32 (1990))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCDM8(Nature 329: 840-842 (1987)、pRSVneo、pSV2-neo、pcDNAI/Amp(Invitrogen)、pcDNAI、pAMoERC3Sc、pCDM8(Nature 329: 840 (1987))、pAGE107(Cytotechnology 3: 133 (1990))、pREP4(Invitrogen)、pAGE103(J.Biochem. 101: 1307 (1987))、pAMoA、pAS3-3、pCAGGS(Gene 108: 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1(Invirtogen)、pZeoSV(Stratagene)等が発現ベクターとして挙げられる。プロモーターとしては、サイトメガロウイルスの IE 遺伝子のプロモーター及びエンハンサー、SV40 の初期プロモーター、RSV、HIV 及び MMLV 等のレトロウイルスの LTR、メタロチオネインβ-アクチン、伸長因子 1、HSP 等の動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等を挙げができる。その他、上述のようにウイルスペクターを用いることもできる。ウイルスペクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、HIV 等の DNA 及び RNA ウィルスが挙げられる。

動物細胞宿主としては、マウス・ミエローマ細胞(例えば、SP2/0、NS0 等)、ラット・ミエローマ細胞(例えば、YB2/0 等)、マウス・ハイブリドーマ細胞、Nmalw<sup>a</sup> 細胞(KJM-1 細胞等も含む)、ヒト胎児腎臓細胞(293 細胞等)、ヒト白血病細胞(BALL-1 等)、CHO 細胞、COS 細胞(COS-1、COS-7 等)、ハムスター胎児腎臓細胞(BHK 等)、マウスセルトリ細胞(TM4 等)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76 等)、HBT637 細胞、HeLa 細胞、ウサギ腎臓細胞(MDCK 等)、ヒト肝臓細胞(HepG2 等)、マウス乳癌細胞(MMT060562 細胞)、TRI 細胞、MRC 細胞、FS3 細胞等がある。

発現ベクターの導入方法としては、宿主及びベクターの種類に依存するが、細胞に Db をコードする DNA を導入できる方法であれば、いずれも用いることができる。原核細胞へベクターを導入する方法としては、カルシウムイオンを用いる方

- 16 -

法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69: 2110 (1972))、プロトプラスト法(特開昭63-24829号公報)、エレクトポレーション法(Gene 17: 107 (1982); Molecular&General Genetics 168: 111 (1979))等があり；酵母への導入方法としては、エレクトポレーション法(Methods in Enzymology, 194: 182 (1990))、スフェロプラス法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 4889 (1984))、酢酸リチウム法(J.Bacteriol. 153: 163 (1983))等があり；植物細胞についてはAgrobacterium法(Gene 23: 315 (1983); WO89/05859 等)や、超音波処理による方法(WO91/00358)等が知られる；動物細胞へベクターを導入する方法としてはエレクトポレーション(Cytotechnology 3:133 (1990))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075号公報)、リポフェクション法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973))、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラノン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法等が挙げられる。

上述のようにして取得された形質転換体は、例えば、以下の方法で培養することができる。

形質転換体が原核生物や真核微生物である場合は、培地は該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等の生育に必要な物質を含有し、形質転換体の効率的な培養を可能にするものであれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は好気的条件、嫌気的条件のいずれで行ってもよく、生育温度、培地のpH、生育時間等の条件は、用いる形質転換体の種類に応じ適宜当業者により決定され得るものである。また、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターについては、必要に応じてインデューサーを培地に添加すればよい(例えば、lacプロモーターであればIPTG、trpプロモーターであればIAA等)。

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、培地としてはTNM-FH培地(Pharmingen)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies)、ExCell1400及びExCell1405(JRH Biosciences)、Grace's Insect Medium(Nature 195: 788 (1962))等を用いることができ、必要に応じゲンタマイシン等の抗生物質を添加してもよい。

- 17 -

形質転換体が動物細胞である場合には、一般に使用されている RPMI1640 培地(The Journal of American Medical Association 199: 519 (1967))、Eagle の MEM 培地(Science 122: 501 (1952))、DMEM 培地(Virology 8: 396 (1959))、199 培地(Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73: 1 (1950))、または、これらの培地に BSA 等を添加した培地を使用することができる。培養は通常の条件、例えば、pH6~8、30~40°C、5%CO<sub>2</sub>存在下で行うことができる。この際、必要に応じカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

このようにして得られた本発明の Db は、宿主細胞内、または、シグナル配列を用いて細胞外に分泌させた場合には培地等から単離し、実質的に純粋なポリペプチドとして精製することもできる。ポリペプチドの分離、精製は、一般的に使用される、クロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈澱、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等の方法を適宜選択し、必要に応じて組合せることにより行うことができる。クロマトグラフィーとしては、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Charcterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988))。これらのクロマトグラフィーは、HPLC や FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、本発明の Db は抗原に対して結合することから、抗原への結合性を利用して精製することも可能である。

さらに、本発明は上述の scDb ライブライマーの作成方法において用いることができる、(I)2つの抗体可変領域をコードし、一方の可変領域と他方の可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、及び(II)2つの抗体可

- 18 -

変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子に関する。これらの本発明の scDb ライブライリーの作成における材料となる遺伝子の可変領域は好ましくは、scFv として発現されるように重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが長いリンカーで結合されているものである。~~scDb~~ (I)または(II)を含む発現ベクターをバクテリオファージコート蛋白質融合(Smith, Science 228: 1315 (1985); Scott and Smith, Science 249: 386 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 309 (1990); Devlin et al., Science 249: 404 (1990); Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 597 (1992); 米国特許第 5,223,409 号)等の方法によりファージ粒子表面上にディスプレイさせ、ディスプレイされたペプチドの表現型により選択することにより、それをコードする遺伝子も同時に得られるという点で有利である。

(I)及び(II)の遺伝子、または、該遺伝子を含む抗体ライブライリーを制限酵素処理し、連結することで本発明の 4 つの抗体可変領域をコードし、1 番目の抗体可変領域と 2 番目の抗体可変領域の間、及び 3 番目の抗体可変領域と 4 番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在する遺伝子を得ることができる。このような遺伝子において、1 番目と 2 番目の抗体可変領域の間及び 3 番目と 4 番目の抗体可変領域の間を短いリンカーで、2 番目と 3 番目の抗体可変領域の間を長いリンカーで結合し、且つ、1 番目が第一の抗原に対する重鎖可変領域、2 番目が第二の抗原に対する軽鎖可変領域、3 番目が第二の抗原に対する重鎖可変領域、そして 4 番目が第一の抗原に対する軽鎖可変領域の順で並んでいると、これを発現させた場合に二特異性单鎖ダイアボディを得ることができる。

本発明は、このような遺伝子を含むベクター及びライブライリー、並びに、該遺伝子によりコードされるペプチドを含むものである。

本発明はまた、

(a) 抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が 2 つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブライリーを作成する工程、

- 19 -

(b)上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び  
(c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法を提供する。この方法により、本発明の scDb ライブラリーの作成方法を一特異性 Db へ応用することができる。例えば、ファージライブラリー構築時にリンカー内に例えば、下記のような BamHI サイト(下線部)を二箇所設けておく。

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer (配列番号: 3)  
GGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCCGGAGGTGGTGGATCC (配列番号: 4)

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子（例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミドあるいは上記ファージライブラリーから PCR を用いて増幅した遺伝子など）を、BamHI で処理し、自己閉環させることでリンカーの長さを scFv 用の 20 残基からダイアボディに最適の 5 残基 (“GGTGGTGGTGGATCC (配列番号: 5)”

によりコードされる "GlyGlyGlyGlySer (配列番号: 6)" ) にすることが出来る。こうして出来た受容体結合抗体を含む VL-VH 断片を適當な発現ベクターに挿入することによって生物活性を指標に Db をスクリーニングすることが出来る。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築した Db ライブラリーをレトロウイルスベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニスト Db を選択することができる。

本発明の scDb は、従来知られている多特異性抗体と同様に、免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。例えば、腫瘍細胞を殺す等の細胞障害性を誘起するため、ワクチンアジュバントとして、血栓溶解剤等の薬剤を適切に生体内において標的に対して運搬するため、酵素により活性

- 2 0 -

化されるプロドラッグを標的部位において確実に変換するため、感染性の疾患の治療用に、細胞表面受容体に対して免疫複合体を誘導するため、免疫毒素等を腫瘍細胞等の標的細胞に運搬するため等、様々な治療目的が考えられる。

このような治療目的で使用される本発明の Db を含む医薬組成物は、必要に応じ、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween 等)、キレート剤(EDTA 等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び单糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトル等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトル、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG 等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート 80、HCO-50)等と併用してもよい。

また、必要に応じ本発明の Db をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16<sup>th</sup> edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の Db に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem.Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第 3,773,919 号; 欧州特許出願公開(EP)第 58,481 号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP 第 133,988 号)。

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、例えば、動脈内注射、

- 21 -

静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮または経口等の経路により当業者に公知の方法により行い得る。投与量は、患者の体重、年齢、疾病の種類、症状、投与方法等の種々の要因により変化するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

また、本発明の Db をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、naked プラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスペクター、アデノウイルスペクター、ワクシニアウイルスペクター、ポックスウイルスペクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJ ベクター等の各種ウイルスペクターとして形成するか(Adolph 『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florid (1996) 参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(WO93/17706 等)して投与することができる。しかしながら、生体内において Db が発現され、その作用を發揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路(静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介する注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。*ex vivo*においてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第 4,945,050 号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髄由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の Db をコードする遺伝子を投与してもよい。

本発明の Db は酵素免疫分析に用いることもできる。このためには、Db の一方の抗体可変領域は酵素上の酵素活性を阻害しないエピトープを、そして他方は担体に結合するような担体を認識するように設計する。例えば、IgG、フェリチン、HRP 及びホルモン等を認識する Db を挙げることができる。

また、本発明の Db は *in vivo* 及び *in vitro* における種々の疾病的免疫診断に用いることも可能である。例えば、Db の一方の抗体可変領域を腫瘍細胞に特異的な抗原等を認識するようにし、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計

- 22 -

することができる。検出可能なマーカーとしては放射性同位体(例えば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I 等)、蛍光色素(フルオレセイン、ルシフェリン等)、化学ルミネセンス化合物(イソチオシアネート、ローダミン等)、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、HRP 等の汎用の酵素等を挙げることができ、Db のこれらの物質との結合及び検出は公知の方法に従って行うことができる(Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry 13: 1014 (1974); Pain et al., J.Immunol.Meth. 40: 219 (1981); Nygen, J.Histochem and Cytochem 30: 407 (1982)参照)。

このように検出可能な物質に対して反応性を有する本発明の Db は、拮抗的結合分析、直接的及び間接的なサンドイッチ免疫分析(ELISA 等)、免疫沈降分析(Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", pp.147-158, CRC Press Inc. (1987))等を含む、種々の分析において用いることができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗原A、Bに対する二特異性 scDb ライブライマーの構築方法を概略的に示す図である。

図2は、ファージ抗体ライブライマーからの Db ライブライマーの構築方法を概略的に示す図である。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規な二特異性 scDb ライブライマーの構築法が提供される。本発明の方法により、二特異性 scDb ライブライマーを scFv のファージライブライマーから煩雑な処理なしに一括処理により作成することができる。また、本発明は、ファージ抗体ライブライマーからパニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提供するものである。

- 2 3 -

### 請求の範囲

1. 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切斷部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子。
2. リンカーに制限酵素切斷部位が2つ以上存在することを特徴とする請求項1記載の遺伝子。
3. 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項1または2記載の遺伝子。
4. 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の遺伝子。
5. 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切斷部位を付加した遺伝子。
6. 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項5記載の遺伝子。
7. 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項5または6記載の遺伝子。
8. 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切斷部位が存在することを特徴とする遺伝子。
9. 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間が短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項8記載の遺伝子。
10. 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である請求項8～9記載の遺伝子。
11. 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第

- 2 4 -

二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる請求項 10 記載の遺伝子。

12. 以下の工程を含む二特異性单鎖ダイアボディをコードする遺伝子の作成方法

- (a)請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b)請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、

を含む方法。

13. 請求項 1～11 いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド。

14. 請求項 1～11 のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー。

15. 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法。

- (a)第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (b)第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (c)(a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (d)上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程。

16. 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法

- (a)請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b)請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

- 25 -

(c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程。

17. 以下の工程を含む抗体ライブラー又は発現ベクターの作成方法、

(a)抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラーを作成する工程、

(b)上記ファージライブラー又は該ファージライブラーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程。

18. 請求項1～11いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクター。

1 / 2

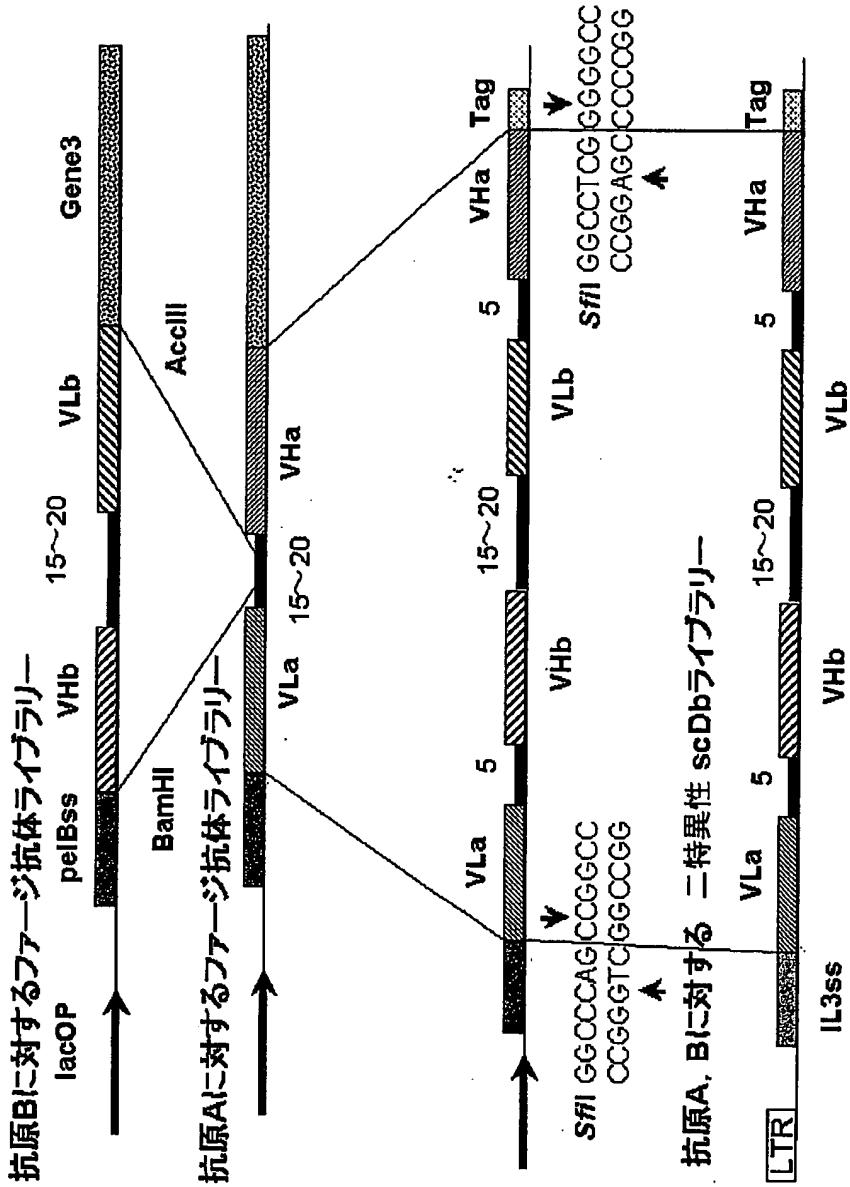
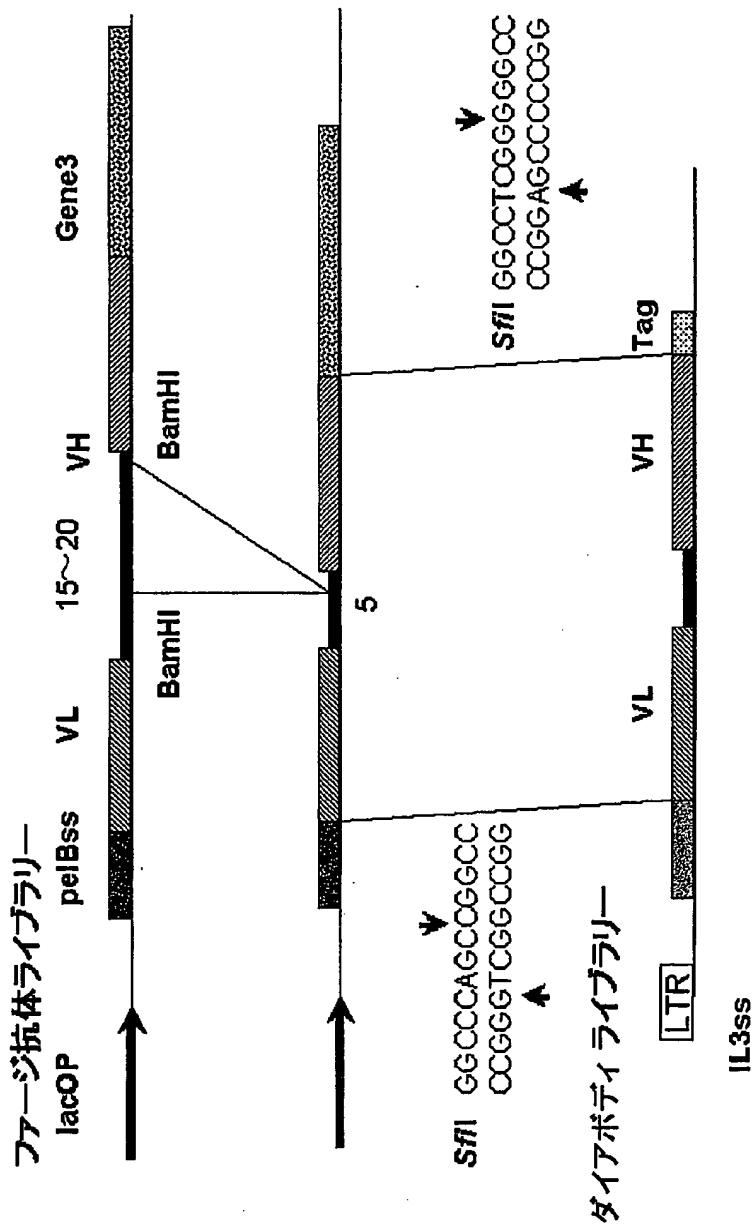


図 1

2 / 2



1 / 4

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A method for scDb library construction

<130> C1-A0203P

<140>

<141>

<150> JP 2002-112369

<151> 2002-04-15

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

2 / 4

<400> 1

ggtgtgtggtg gatccgggtgg tggtggttct ggccggcggcg gctccggagg tggtggttct 60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 / 4

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 3

ggtgtggtg gatccgggtgg tggtggttct ggccgcggcg gctccggagg tggtggtatcc 60

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4 / 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 5

ggtgtggtg gatcc

15

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04773

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/46, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/46, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
SwissProt/PIR/GeneSeq

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCGUINNESS B.T. et al., Phage diabody repertoires for selection of large number of bispecific antibody fragments. Nature Biotechnology 1996, Vol.14, No.9, pages 1149 to 1154	1-11,13,14, 18 12,15-17
A	DENARDO D.G. et al., Anti-HLA-DR/anti-DOTA diabody construction in modular gene design platform: bispecific antibodies for pretargeted radioimmunotherapy. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2001, Vol.16, No.6, pages 525 to 535	1-18
A	ANDRIS-WIDHOPF J. et al., Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. Journal of Immunological methods 2000, Vol.242, pages 159 to 181	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
02 May, 2003 (02.05.03)

Date of mailing of the international search report  
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04773

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TURNER D.J. et al., Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimization of peptide sequence using phage display technology. Journal of Immunological methods 1997, Vol.205, pages 43 to 54	1-18
A	TANG Y. et al., Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. The Journal of Biological Chemistry 1996, Vol.271, No.26, pages 15682 to 15686	1-18
A	HOLLIGER P. et al., "Diabodies", small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 1993, Vol.90, pages 6444 to 6448	1-18

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C07K 16/46, C12N 15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.C1' C07K 16/46, C12N 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	MCGUINNESS B. T. et al, Phage diabody repertoires for selection of large number of bispecific antibody fragments. Nature Biotechnology 1996, Vol. 14, No. 9, p. 1149-1154	1-11, 13, 14, 18 12, 15-17
A	DENARDO D. G. et al, Anti-HLA-DR/anti-DOTA diabody construction in modular gene design platform:bispecific antibodies for pretargeted radioimmunotherapy. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 2001 Vol. 16, No. 6, p. 525-535	1-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.05.03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

富永 みどり

4 N 9152



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き)、関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	ANDRIS-WIDHOPP J. et al, Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. Journal of Immunological methods 2000, Vol. 242, p. 159-181	1-18
A	TURNER D. J. et al, Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments:optimisation of peptide sequence using phage display technology. Journal of Immunological methods 1997, Vol. 205, p. 43-54	1-18
A	TANG Y. et al, Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. The Journal of Biological Chemistry 1996, Vol. 271, No. 26, p. 15682-15686	1-18
A	HOLLIGER P. et al, "diabodies":small bivalent and bispecific antibody fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, Vol. 90, p. 6444-6448	1-18

## DESCRIPTION

## METHODS FOR CONSTRUCTING scDb LIBRARIES

5    Technical Field

The present invention relates to single chain diabody (scDb) libraries and to methods for constructing such libraries. The present invention also relates to genes comprised in such scDb libraries, expression vectors comprising these genes, and methods 10 for constructing these genes and vectors. The invention further relates to peptides encoded by these genes.

Background Art

Multi-specific antibodies, capable of binding to different 15 antigens (bispecific antibodies (bsAb), for example), are useful in clinical fields such as immunodiagnosis, immunotherapy, and diagnosis based on immunoassays. For example, multi-specific antibodies can be used for immobilizing enzymes used for enzyme immunoassays. In such cases, one arm of a multi-specific antibody is designed to bind 20 to an epitope on an enzyme region that does not interfere with the enzyme reaction. The other arm is designed to bind to an immobilizing carrier, so that the enzyme is immobilized on the carrier via the antibody (Hammerling et al., J. Exp. Med. 128: 1461-1473 (1968)). In addition, it has been reported that multi-specific antibodies can 25 be used for immunodiagnosis of a variety of diseases, including cancers (Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990)). For example, bispecific antibodies used for cancer diagnosis are designed such that one arm of the antibody recognizes a tumor-related antigen, and the other arm binds to a detectable marker (for example, 30 Le Doussal et al., Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992); Le Doussal et al., J. Nucl. Med. 34: 1662-1671 (1993); Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650-6655 (1991)).

Furthermore, in patients, multi-specific antibodies are known 35 to be used for inducing cellular immune responses against pathogens or tumor cells (Segal and Snider, Chem. Immunol. 47: 179-213 (1989); Segal et al., Biologic Therapy of Cancer 2(4) De Vita et al. eds.,

J.B.Lippomcott, Philadelphia (1992) p.1; Hsieh-Ma et al., Cancer Res. 52: 6832-6839 (1992); Weiner et al., Cancer Res. 53: 94-100 (1993)). Multi-specific antibodies can also be designed to induce T-cell-mediated cytotoxicity (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175(1): 5 217-225 (1992); de Liji et al., "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal eds., Lienhart (1991) p.249; Clark et al., "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds. Lienhart (1991) p.243; Kroesen et al., Cancer Immunol. Immunother. 10 37: 400-407 (1993); Kroesen et al., Br. J. Cancer 70: 652-661 (1994); Weiner et al., J. Immunol. 152: 2385-2392 (1994)). Moreover, multi-specific antibodies can be used as fibrinolytic agents or vaccination adjuvants, and also for treatment of infectious diseases (for example, targeting cells infected with HIV, influenza, 15 trypanosomes, and such), delivering antitoxins to tumor cells, and bringing immune complexes to cell surface receptors (Fanger et al., as described above).

Conventionally, multi-specific antibodies were produced by methods such as (1) chemical coupling of different antibodies with 20 distinct specificities using hetero-bifunctional linkers (Paulus, Behring Inst. Mitt., 78:118-132 (1985)); (2) fusion of hybridoma cells secreting different monoclonal antibodies (Milstein and Cuello, Nature 305: 537-539 (1983)); and (3) transfection of genes encoding light chains and heavy chains of different monoclonal antibodies (four 25 genes) into mouse myeloma cells or other eukaryotic expression systems, followed by isolating monovalent portions with bispecificity (Zimmermann, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-256 (1986); van Dijk et al., Int. J. Cancer 43: 944-949 (1989)).

Diabodies (Db) are bivalent antibody fragments constructed by 30 gene fusion (Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); EP 404,097; WO93/11161). Diabodies are dimers comprising two polypeptide chains, where each polypeptide chain comprises a light chain variable domain ( $V_L$ ) and a heavy chain variable domain ( $V_H$ ) connected with a linker short enough to prevent interaction 35 of these two domains, for example a linker of about five amino acids. The  $V_L$  and  $V_H$  domains encoded on the same polypeptide chain will form

a dimer because the linker between the  $V_L$  and  $V_H$  is too short to form a single chain variable region fragment (scFv). Thus, the result is a diabody that comprises two antigen-binding sites. If the  $V_L$  and  $V_H$  domains directed against two different antigens (a and b) are expressed simultaneously as combinations of  $V_{La}-V_{Hb}$  and  $V_{Lb}-V_{Ha}$  connected with a linker of about five residues, they can be secreted as a bispecific diabody. Bispecific diabodies are a type of multi-specific antibody.

10 Disclosure of the Invention

Since there are three ways to combine two types of chains, the yield of bispecific diabodies is limited to 50% of the total. On the other hand, when using phage antibody libraries to select particular genes based on their antigen reactivity, the  $V_H$  and  $V_L$  domains must be connected with a linker of about 15 residues and expressed in order to present the antigen-binding site as an scFv. Therefore, after using antigen binding to select the  $V_H$  and  $V_L$  domains of an scFv from a phage antibody library, complicated manipulations such as PCR assembly are required to express these domains as bispecific scDbs. Such complicated manipulations are needed to change the linker length from about 15 residues, as required for scFv expression, to about five residues, which enables diabody expression. This makes it difficult to collectively express the  $V_H$  and  $V_L$  domains of scFvs as bispecific scDbs.

The present invention provides novel methods for constructing bispecific scDb libraries. The present invention produces bispecific diabodies with certainty, by expressing  $V_H$  and  $V_L$  domains directed against two different antigens (a and b) as a single chain in the order  $V_{La}-V_{Hb}-V_{Lb}-V_{Ha}$ , with a linker of 15 or more residues between  $V_{Hb}$  and  $V_{Lb}$ . (However, the present invention is not limited by the order of the variable domains such as  $V_{La}$ ,  $V_{Ha}$ ,  $V_{Lb}$ , and  $V_{Hb}$ ). In the present invention, bispecific scDb libraries expressing such polypeptide chains ( $V_{La}-V_{Hb}-V_{Lb}-V_{Ha}$ ) can be constructed in one step from scFv phage libraries. Specifically, two genes are prepared. First gene comprises nucleotides encoding two antibody variable domains ( $V_{La}$  and  $V_{Ha}$ ) connected by a linker containing a restriction

enzyme site. Second gene comprises nucleotides encoding two antibody variable domains ( $V_{Lb}$  and  $V_{Hb}$ ) connected by a long linker, comprising restriction enzyme sites at the nucleotide ends not connected to the linker. The genes are treated with restriction enzymes, and then 5 combined by ligation to place the  $V_{Lb}$  and  $V_{Hb}$  between the  $V_{La}$  and  $V_{Ha}$ . In addition to methods for constructing bispecific scDb libraries, the present invention provides genes used in the methods, genes obtained by the methods, expression vectors or antibody libraries comprising these genes, and peptides encoded by these genes.

10 In addition, as methods for collectively expressing, as bispecific scDbs, scFv  $V_H$  and  $V_L$  domains selected by antigen binding, the present invention provides methods for collectively transferring antibody clones concentrated by panning and such, from a phage antibody library into expression vectors for use in animal cells.

15 More specifically, the present invention relates to:

- (1) a gene encoding two antibody variable domains, wherein the two antibody variable domains are connected by a linker comprising a restriction enzyme site;
- (2) the gene of (1), wherein the linker comprises two or more restriction enzyme sites;
- (3) the gene of (1) or (2), wherein one of the two antibody variable domains is a heavy chain variable domain and the other is a light chain variable domain;
- (4) the gene of any one of (1) to (3), wherein the two antibody variable domains are connected by a long linker;
- (5) a gene encoding two antibody variable domains, where both ends comprise a restriction enzyme site;
- (6) the gene of (5), wherein one of the two antibody variable domains is a heavy chain variable domain and the other is a light chain variable domain;
- (7) the gene of (5) or (6), wherein the two nucleotides encoding the two antibody variable domains are connected with a long linker;
- (8) a gene encoding four antibody variable domains, wherein the gene comprises a restriction enzyme site between the first and second antibody variable domains, and between the third and fourth

antibody variable domains;

(9) the gene of (8), wherein the first and second antibody variable domains are connected with a short linker, the third and fourth domains are connected with a short linker, and the second and third antibody variable domains are connected with a long linker;

(10) the gene of (8) or (9), wherein the four antibody variable domains are a heavy chain variable domain and a light chain variable domain directed against a first antigen, and a heavy chain variable domain and a light chain variable domain directed against a second antigen;

(11) the gene of (10), wherein the four antibody variable domains are comprised in the order: a light chain variable domain against the first antigen, a heavy chain variable domain directed against the second antigen, a light chain variable domain against the second antigen, and a heavy chain variable domain against the first antigen;

(12) a method for constructing a gene encoding a bispecific single chain diabody, wherein the method comprises:

20 (a) treating the gene of any one of (1) to (4) with a restriction enzyme;

(b) treating the gene of any one of (5) to (7) with a restriction enzyme; and

(c) inserting the gene constructed in step (b) into the gene constructed in step (a);

25 (13) a peptide encoded by a gene of any of (1) to (11);

(14) an antibody library comprising a gene of any of (1) to (11);

(15) a method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

30 (a) constructing an antibody phage library in which a light chain variable domain and a heavy chain variable domain, both directed against a first antigen, are connected with a long linker comprising a restriction enzyme site;

(b) constructing an antibody phage library in which a light chain variable region and a heavy chain variable domain, both directed against a second antigen, are connected with a long

linker at one end, where the other ends comprise a restriction enzyme site;

5           (c) treating the phage libraries constructed in steps (a) and (b), or genes comprising the variable domains prepared from these phage libraries, with a restriction enzyme; and

10          (d) performing ligation of the fragments obtained from the above treatment to construct a fragment in which the heavy and light chain variable domains against the second antigen are inserted between the light and heavy chain variable domains against the first antigen;

(16) a method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

15          (a) treating the gene of any one of (1) to (4) with a restriction enzyme;

             (b) treating the gene of any one of (5) to (7) with a restriction enzyme; and

             (c) inserting the gene constructed in step (b) into the gene constructed in step (a);

(17) a method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

20          (a) constructing an antibody phage library in which a light chain variable domain and a heavy chain variable domain, both against an antigen, are connected with a long linker comprising two or more restriction enzyme sites;

25          (b) treating the above phage library, or genes comprising variable domains prepared from the phage library, with a restriction enzyme; and

             (c) performing self-ligation of the fragments obtained above to shorten the linker between the variable domains; and

30          (18) an expression vector comprising a gene of any one of (1) to (11).

The methods of the present invention can be applied not only to screening bispecific scDbs, but also for screening monospecific scDbs (for example, scDbs comprising the variable domains of different sequences but still able to recognize the same epitope).

In the methods for constructing scDb libraries of the present

invention, as shown in Fig. 1, for example, an antibody phage library is first constructed from spleens and such of animals immunized with antigen A. The library is constructed such that the variable domains are linked in the order of V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>. Antibody phage libraries can be 5 constructed according to known methods (for example, McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 582-597 (1991)).

Examples of antigens used for animal immunization are complete antigens with immunogenicity, and incomplete antigens (including 10 haptens) without immunogenicity. Antigens may be substances consisting of proteins, polypeptides, polysaccharides, nucleic acids, lipids, etc. However, in the present invention, the type of substance that may constitute an antigen is not restricted. Immunogens used for immunizing animals may also be antigens that can solubilize on 15 conjugation with other molecules. They can also be antigen fragments. When transmembrane molecules such as receptors are used as antigens, a fragment thereof may be preferably used (an extracellular domain of the receptor, for example). In addition, cells expressing transmembrane molecules on their surface can be used as immunogens. 20 Such cells may be those obtained naturally (tumor cell lines, etc.), or those designed to express transmembrane molecules using recombinant technology.

Bispecific diabodies can be used in the same manner as conventionally known bispecific antibodies. Therefore, for 25 treatment of cancers, for example, bispecific diabodies may be designed such that one arm recognizes a tumor cell antigen and the other recognizes a molecule capable of inducing cytotoxicity. In this case, tumor cell antigens can be selected from molecules such as CD15, p185<sup>HER2</sup>, 1D10 (malignant B cell), p97, renal cell carcinoma, 30 OVCAR-3, L-D1 (colon cancer), melanocyte stimulating hormone analogue, EGF receptor, CAMA1, MoV18, CD19, NCAM (neural cell adhesion molecule), FBP (folic acid binding protein), AMOC-31 (pan carcinoma associated antigen), Id-1, CD22, CD7, CD38, and CEA. Molecules capable of inducing cytotoxicity may be Fc<sub>Y</sub>RI, CD16, and CD3. Alternatively, 35 in place of the above cytotoxicity-inducing molecules, diabodies can be designed to bind to toxins such as saponin, ricin A chain, IFN- $\alpha$ ,

and vinca alkaloids. Such bispecific diabodies are extremely useful in the treatment of cancers.

In addition, bispecific diabodies are useful as agonist antibodies. For example, many cytokine receptors are known to exist 5 as homo- or hetero-dimers, and it is thought that ligand binding induces a change in distances and angles between the chains involved in dimer formation, and elicits signal transduction inside cells. Thus, bispecific diabodies capable of binding to such receptor dimers can mimic ligand-induced dimerization of the receptor, and therefore 10 function as agonist diabodies.

In another embodiment, bispecific diabodies may be (1) diabodies involving enzymes that promote substance conversion, such as diabodies that bind to CD30 and alkaline phosphatase, thereby converting mitomycin phosphate to mitomycin alcohol; (2) diabodies 15 that can be used as fibrinolytic agents, such as those that bind to fibrin, tPA, uPA, and such; (3) diabodies delivering an immune complex to cell surface receptors by binding to an LDL receptor, Fc receptor (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII or Fc $\gamma$ RIII), and such; and (4) diabodies used for treatment of infectious diseases, recognizing T-cell antigens such 20 as CD3, and antigens from pathogens such as HCV, influenza, and HIV; (5) diabodies capable of binding to tumor antigens that can be used for tumor detection, and detectable compounds such as EOTUBE, DPTA, and haptens; and (6) diabodies that can be used as vaccination adjuvants (Fanger et al., Crit. Rev. Immunol. 12: 101-124 (1992)); 25 and (7) diabodies that can be used for diagnosis, directed against a detectable compound such as rabbit IgG, horse radish peroxidase (HRP), FITC, and  $\beta$ -galactosidase, and against antigens such as hormones, ferritin, somatostatin, substance P, and CEA. However, the diabodies of the present invention are not limited thereto.

30 Next, antigens are used to immunize suitable mammals. For example, mice, hamsters, or rhesus monkeys can be used for immunization. Alternatively, lymphocytes can be immunized *in vitro*. Subsequently, DNAs encoding antibodies that are comprised in the lymphocytes or in the spleens of immunized animals are isolated 35 according to well-known methods (for example, using a nucleotide probe capable of binding specifically to genes encoding antibody heavy

chains and light chains).

Herein, heavy chain and light chain variable domains mean portions of immunoglobulin heavy chains and light chains that comprise usually about 110 amino acids from the N-terminus. Immunoglobulins  
5 are classified into different classes (IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM), which are further classified into several subclasses (isotypes; IgG-1, IgG-2, IgG-3, and IgG-4, and IgA-1, and IgA-2, for example). The heavy chain and light chain variable domains of the present invention may belong to any of the above classes and subclasses, and are not  
10 specifically limited.

The antibody variable domains of the present invention may be shortened or altered antibody fragments, as long as they comprise the ability to bind to a desired antigen. An "Fv" fragment is a minimal antibody fragment, comprising a complete antigen recognition site  
15 and binding site. This domain is a dimer comprising heavy chain and light chain variable domains strongly connected by non-covalent bonds. Three complementarity determining regions (CDRs; hyper variable regions) in each variable domain interact with each other to form antigen binding sites on the dimer surface. Thus, on combining the  
20 heavy chain and light chain, an antibody has six CDRs functioning as antigen binding sites. However, it is known that a single variable domain is still capable of recognizing and binding to an antigen, albeit with a lower affinity than when including all binding sites. Therefore, it is especially preferred that the antibody variable  
25 domains making up the diabodies of the present invention are Fv fragments, but they are not limited thereto, as long as they retain a CDR from a heavy chain or light chain, and can recognize and bind to an antigen.

In addition, a technology using gene engineering to create  
30 "humanized antibodies" is known. In this technology, all but the CDR of monoclonal antibodies from non-human mammals (such as mice, rats, and hamsters) is replaced with frame structure sequences of variable domains from human immunoglobulins (see for example, Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329  
35 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)). Humanized antibodies may comprise amino acids that are comprised in

neither the CDR introduced into the recipient antibody nor the frame structure sequences. Normally, such introduction of amino acid residues is performed to optimize antibodies for more precise antigen recognition and binding. The variable domain of the present invention also comprises altered variable domains, such as humanized domains.

In addition, other regions of the variable domain can be altered to improve biological features of antibodies, such as antigen binding. Such alterations can be performed using site-directed mutagenesis (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985)), PCR mutagenesis, cassette mutation, and such. In general, mutated antibodies with improved biological features have an amino acid sequence with a homology or similarity of 70% or higher, preferably 80% or higher, and more preferably 90% or higher (for example, 95% or higher) compared to the original antibody heavy chain or light chain variable domain. Herein, sequence homology or similarity is defined as the percentage of amino acids that are homologous (having the same residues) or similar (having residues categorized into the same group based on general features of the side chain) to the original residues, determined after conducting any alignment of sequences and introduction of gaps necessary to obtain the maximal sequence homology.

Natural amino acid residues are usually categorized, based on the characteristics of their side chain, into (1) hydrophobic residues: norleucine, methionine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; (2) neutral hydrophilic residues: cysteine, serine, threonine, asparagine, and glutamine; (3) acidic residues: aspartic acid, and glutamic acid; (4) basic residues: histidine, lysine, and arginine; (5) residues influencing chain orientation: glycine and proline; and (6) aromatic residues: tryptophan, tyrosine, and phenylalanine.

Subsequently, the isolated DNAs encoding the heavy and light chains are connected with a linker of about 20 residues, and cloned into an appropriate phage vector to construct a phage library. The linker is designed to comprise recognition sites for restriction enzymes such as BamHI and AccIII. Such linkers may comprise, for

example, the following sequences:

BamHI	AccIII
GGTGGTGG <u>TGGATCC</u> GGTGGTGGTTCTGGCGGC <u>GGCTCCGGAGGTGGTGGTTCT</u>	
(SEQ ID NO: 1)	
5 CCACCAACC <u>ACCTAGG</u> CCACCACCAAGACCGCCGCC <u>GAGGCCTCCACCACCAAGA</u>	
GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlySer	
(SEQ ID NO: 2)	

The restriction enzyme recognition sites used in the method of the present invention may be those for BamHI, AccIII, AluI, EcoRI, 10 HincII, HindIII, HinfI, NotI, SacI, SalI, Sau3AI, SmaI, TaqI, XbaI, AatI, BclI, BstEII, EheI, KpnI, NheI, PstI, PvuII, SfiI, BgII, HaeIII, HhaI, HpaII, XhoI, and such.

In addition, phages constituting a phage library may be G4 phages, M13 phages, fd phages, f1 phages,  $\lambda$  phages, T4 phages, T7 phages, 15 P1 phages, MS2 phages,  $\Phi$ K phages,  $\Phi$ X174 phages,  $\lambda$ gWES,  $\lambda$ B, Charon 4A, Charon 30, and such.

Similarly, an antigen different to antigen A, or the same antigen (aimed at a different epitope, for example) is used to immunize animals or lymphocytes; DNAs encoding antibody heavy chains or light 20 chains are isolated; and an antibody phage library is constructed in which the variable domains are connected, in the order of  $V_H$ - $V_L$ , with a linker of about 20 residues. Therein, the 5'-terminus of  $V_H$ b and the 3'-terminus of  $V_L$ b are designed to comprise recognition sites for restriction enzymes so that the genes encoding  $V_H$ b and  $V_L$ b, which 25 can bind antigen B, are inserted between the genes encoding  $V_L$ a and  $V_H$ a, which can bind antigen A. Thus, if a library for antigen A is constructed using BamHI and AccIII recognition sites, the 5'-terminus of  $V_H$  and the 3'-terminus of  $V_L$  are designed to comprise BamHI and AccIII, respectively.

30 Next, the above phage libraries, or genes prepared from these phage libraries and comprising the variable domains (for example, phagemids concentrated by panning and such from the respective libraries (e.g. Vaughan et al., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996)), or genes amplified by PCR from the above phage libraries) 35 are treated with the restriction enzymes whose recognition sites were placed in the linker and terminals of the genes encoding  $V_H$  and  $V_L$ .

For example, in the above case, where the linker comprises recognition sites for BamHI and AccIII, treatment is with BamHI and AccIII. The obtained genes, which encode  $V_H$ - $V_L$  antibody fragments against antigen B, are inserted between the BamHI and AccIII sites of the antibody phagemid against antigen A. In this way, discDb libraries comprising a variety of combinations of antibodies against A and against B can be constructed.

In the present invention, a "linker" is not specifically limited as long as it does not interfere with expression of the antibody variable domains that are connected at both of its ends; the linker may or may not comprise restriction enzyme sites. Herein, a "long linker" means a linker of a size that enables the antibody heavy chain and light chain variable domains to be present as a scFv when the domains combined with the linker are expressed in a phage library. The length is not particularly limited, but preferably 30 bp to 150 bp, more preferably 36 bp to 90 bp, and most preferably 45 bp to 60 bp. Similarly, a "short linker" means a linker of a size that enables formation of a diabody (Db) when antibody heavy chain and light chain variable domains are combined with the linker and expressed. The length is not particularly limited, but preferably 6 bp to 27 bp, more preferably 9 bp to 21 bp, and most preferably 12 bp to 18 bp.

Furthermore, by placing appropriate restriction enzyme sites at the other ends of the gene encoding  $V_{L\alpha}$  and  $V_{H\alpha}$ , which are not connected to the linker, a fragment encoding  $V_{L\alpha}$ - $V_{H\beta}$ - $V_{L\beta}$ - $V_{H\alpha}$  can be cut out, inserted into an appropriate expression vector, and expressed. The biological activity of such fragments can be used as an index to screen for genes that encode desired diabodies. For example, in the above case where BamHI and AccIII are used in a phage antibody library directed against antigens A and B, a fragment may be cut out using another restriction enzyme, such as SfiI, and inserted into an appropriate vector, as shown in Fig. 1. Biological activity used as an index may be, for example, the activity of specifically binding an antigen. Depending on the type of antigen, it may also be an inhibitory activity, agonist activity, antagonist activity, or such. For example, to select an agonist bispecific diabody, a bispecific diabody library constructed using an antibody library against a

cytokine receptor can be inserted into a vector such as a retrovirus vector, and infected into cells whose proliferation is dependent on a desired cytokine.

Methods common to the field of genetic engineering can be used  
5 to carry out procedures for constructing an expression system for  
the diabodies of the present invention, and for constructing  
recombinant vectors appropriate to the hosts (for example, Sambrook  
et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories (1989)).  
Host cells may be prokaryotic cells, such as bacteria, and eukaryotic  
10 cells, such as yeast, animal cells, insect cells, and plant cells,  
as long as the cells are capable of expressing the diabodies of the  
present invention. Mammalian cells are particularly preferred in  
view of glycosylation.

Expression vectors need to comprise units that regulate the  
15 transcription and translation of genetic information, such as  
promoters and terminators. For example, when *Escherichia*  
microorganisms such as *E. coli* are used as hosts, plasmids of the  
pBR or pUC series can be used as plasmid vectors, and any promoters  
selected from those such as lac, trp, tac, trc,  $\lambda$  phage PL, and PR  
20 can be used. Terminators may originate from trpA, phage, and rrnB  
ribosomal RNA. When the hosts are *Bacillus* microorganisms such as  
*B. subtilis*, plasmids such as those of the PUB110 and pC194 series  
can be used, and genes may be integrated into chromosomes in some  
cases. Promoters and terminators may be derived from apr, npr, amy,  
25 and such. Other prokaryotic cells include microorganisms such as  
*Pseudomonas* (e.g. *P. putida*, *P. cepacia*; pKT240 vectors, and such),  
*Brevibacterium* (e.g. *B. lactofermentum*; pAJ43), *Corynebacterium* (e.g.  
*C. glutamicum*; pCS11, pCB101), *Streptococcus* (e.g. pHV1301, pGK1),  
*Lactobacillaceae* (e.g. pAM $\beta$ 1), *Rhodococcus* (e.g. plasmids isolated  
30 from *R. rhodochrous* (J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992)),  
*Streptomyces* (e.g. *S. lividans*, *S. virginiae*; pIJ486, pKC1064,  
pUWL-KS), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*  
(e.g. *S. typhimurium*), *Serratia* (e.g. *S. marcescens*), and *Shigella*.

Among expression systems utilizing eukaryotic microorganisms,  
35 a system using *Saccharomyces cerevisiae* as a host, and plasmids from  
YRp, YEp, YCp, and YIp series is known. Therein, promoters and

terminators such as ADH, GAPDH, PHO, GAL, PGK, and ENO can be used. Other microorganisms used in the expression vector system of the present invention include *Kluyveromyces* (e.g. *K. lactis*; plasmids of the 2  $\mu$ m, pKD1, pGKI1, and KARS series, and such),  
5 *Schizosaccharomyces* (e.g. *S. pombe*; pAUR224), *Zygosaccharomyces* (e.g. *Z. rouxii*; pSB3 and PH05 promoters from *S.cerevisiae*), *Hansenula* (e.g. *H. polymorpha*), *Pichia* (e.g. *P. pastoris*), *Candida* (e.g. *C. maltosa*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, and *C. albicans*), *Aspergillus* (e.g. *A. oryzae*, *A. niger*), and *Trichoderma* (e.g. *T. reesei*).

10 In another embodiment, plant cells may be used as hosts. For example, host cells may be those from cotton, corn, potato, tomato, soybean, petunia, and tobacco. A particularly well-known system uses cells from *Nicotina tabacum*, which are cultured as a callus. To transform plant cells, expression vectors such as pMON530 are  
15 introduced into bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*. By infecting these bacteria into tobacco (*Nicotina tabacum*), desired polypeptides can be obtained from the tobacco leaves.

Cells from insects such as silkworms (*Bombyx mori*), mosquitoes (e.g. *Aede aegypti*, *Aedes albopictus*) and fruit flies (*Drosophila melanogaster*) can be used as hosts. For example, when using silkworms as hosts, DNAs encoding diabodies may be inserted into baculovirus vectors, these vectors may be used to infect silkworms, and desired polypeptides can be obtained from the silkworm body fluids (Nature 315: 592-594 (1985)).

25 Examples of expression vectors when using animal cells as hosts include pME18S (Med. Immunol. 20: 27-32 (1990)), pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)), pCDM8 (Nature 329: 840-842 (1987)),  
pRSVneo, pSV2-neo, pcDNAI/Amp (Invitrogen), pcDNAI, pAMoERC3Sc,  
30 pCDM8 (Nature 329: 840 (1987)), pAGE107 (Cytotechnology 3: 133 (1990)),  
pREP4 (Invitrogen), pAGE103 (J. Biochem. 101: 1307 (1987)), pAMoA,  
pAS3-3, pCAGGS (Gene 108: 193-200 (1991)), pBK-CMV, pcDNA3.1  
35 (Invitrogen), and pZeoSV (Stratagene). Promoters may be cytomegalovirus IE gene promoter and enhancer, SV40 early promoter, a retrovirus LTR such as those from RSV, HIV, and MMLV, and gene promoters from animal cells such as metallothionein,  $\beta$ -actin, elongation factor-1, HSP genes, and such. Alternatively, viral

vectors may be used as above. Viral vectors may be DNA viruses and RNA viruses such as retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes viruses, vaccinia viruses, poxviruses, Simbu viruses, Sendai viruses, SV40, and HIV.

5 Host animal cells may be mouse myeloma cells (e.g. SP2/0, NSO), rat myeloma cells (e.g. YB2/0), mouse hybridoma cells, Namalwa cells (including KJM-1 cells), human embryonic kidney cells (e.g. 293 cells), human leukemia cells (e.g. BALL-1), CHO cells, COS cells (e.g. COS-1, COS-7), hamster embryonic kidney cells (e.g. BHK), mouse Sertoli cells  
10 (e.g. TM4), African green monkey kidney cells (e.g. VERO-76), HBT637 cells, HeLa cells, rabbit kidney cells (e.g. MDCK), human liver cells (e.g. HepG2), mouse mammary tumor cells (e.g. MMT060562), TRI cells, MRC cells, FS3 cells, etc.

Methods for introducing expression vectors depend on the type  
15 of host cell and vector, but any method can be used as long as it facilitates introduction of diabody-encoding DNA into cells. Vectors can be introduced into prokaryotic cells by methods utilizing calcium ions (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110 (1972)), protoplast (Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Sho  
20 63-24829), electroporation (Gene 17: 107 (1982); Molecular & General Genetics 168: 111 (1979)), and such; introduced into yeast cells by using electroporation (Methods in Enzymology, 194: 182 (1990)), spheroplasts (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4889 (1984)), lithium acetate (J. Bacteriol. 153: 163 (1983)), and such; introduced into  
25 plant cells by using *Agrobacterium* (Gene 23: 315 (1983); WO89/05859), sonication (WO91/00358), and such; and into animal cells by using electroporation (Cytotechnology 3: 133 (1990)), calcium phosphate (JP-A Hei 2-227075), lipofection (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973)), co-precipitation with calcium  
30 phosphate, DEAE-dextran, direct injection of DNA using microcapillaries), and such.

Transformant cells obtained as described above can be cultured, for example, by the following methods:

Culture media for transformant cells of prokaryotes and  
35 eukaryotic microorganisms can be natural or synthetic, as long as the media facilitates efficient culture of the transformants, and

comprises utilizable nutrients essential for growth , such as carbon and nitrogen sources, and inorganic salts. Culture may be carried out under aerobic or anaerobic conditions, and other conditions such as temperature, pH of the medium and duration of the culture can be 5 determined appropriately by one skilled in the art, depending on the type of transformant. When using expression vectors equipped with inducible promoters, inducers may be added to the medium as necessary (for example, IPTG for the lac promoter, and IAA for the trp promoter).

When using insect cells as a host, the medium may be used such 10 as TNM-FH medium (Pharmingen), Sf-900 II SFM (Life Technologies), ExCell400 and ExCell405 (JRH Biosciences), and Grace's Insect Medium (Nature 195: 788 (1962)). If necessary, antibiotics such as gentamicin may be added to the medium.

For animal cell transformants, a common medium can be used such 15 as RPMI1640 (The Journal of American Medical Association 199: 519 (1967)), Eagle's MEM (Science 122: 501 (1952)), DMEM (Virology 8: 396 (1959)), and 199 medium (Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73: 1 (1950)), or such media may be added with BSA and the like. Culture can be carried out under normal conditions 20 such as pH 6 to 8, 30 to 40°C, and 5% CO<sub>2</sub>. If necessary, antibiotics such as kanamycin and penicillin may be added to the medium.

The diabodies of the present invention, obtained as above, can be isolated using signal sequences from inside host cells, or from the culture medium if secreted into the extracellular space. They 25 can then be purified as substantially pure polypeptides. Separation and purification of polypeptides can be performed by appropriately selecting or combining methods as necessary. Separation methods can be selected from those generally used, such as chromatography, filtration, ultrafiltration, salting out, solvent precipitation, 30 solvent extraction, distillation, immunoprecipitation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric point focusing, dialysis, and recrystallization. Chromatography includes affinity chromatography, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse phase chromatography, 35 absorption chromatography, and the like (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel

R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). Such chromatographies may be performed using liquid chromatographies such as HPLC, FPLC, 5 and the like. In addition, since the diabodies of the present invention bind antigens, they may be purified by making use of this ability.

Furthermore, the present invention relates to genes that can be used in the above method of constructing scDb libraries, including 10 (I) genes encoding two antibody variable domains that are connected with a linker comprising a restriction enzyme site, and (II) genes encoding two antibody variable domains, attached with restriction enzyme sites at both ends. The variable domains of the genes that provide sources for constructing the scDb libraries of the present 15 invention preferably comprise heavy chain and light chain variable domains connected with a long linker, such that they are expressed as scFvs. An advantage of such genes is that expression vectors comprising (I) or (II) can be displayed on the surface of phage particles using a method such as fusion with bacteriophage coat 20 proteins (Smith, Science 228: 1315 (1985); Scott and Smith, Science 249: 386 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 309 (1990); Devlin et al., Science 249: 404 (1990); Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 597 (1992); USP: 5,223,409), and by 25 selecting clones based on the phenotype of the peptides thus displayed, the genes that encode the clones can be simultaneously obtained.

The genes of (I) and (II), or antibody libraries comprising such genes, may be treated with restriction enzymes, and combined by ligation to obtain genes of the present invention that encode four antibody variable domains and comprise restriction enzyme sites 30 between the first and second variable domains, and between the third and fourth variable domains. Bispecific single chain diabodies can be obtained by expressing such genes if both the first and second variable domains and the third and fourth variable domains are connected with a short linker, and the second and third variable 35 domains are connected with a long linker, and further the variable domains are connected in the order of: heavy chain variable domain

against antigen A, light chain variable domain against antigen B, heavy chain variable domain against antigen B, and light chain variable domain against antigen A.

5 The present invention comprises vectors and libraries comprising such genes, and peptides encoded by these genes.

In addition, the present invention provides methods for constructing antibody libraries or expression vectors, where the methods comprise:

10 (a) constructing antibody phage libraries in which light chain variable domains and heavy chain variable domains against antigens are connected with long linkers comprising two or more restriction enzyme sites,

15 (b) treating the above phage libraries, or genes comprising such variable domains and prepared from these phage libraries, with restriction enzymes, and

(c) performing self-ligation of the thus-obtained fragments to shorten the linkers between the variable domains.

These methods enable the methods for constructing scDb libraries of the present invention to be applied to the preparation of monospecific 20 diabodies. For example, when phage libraries are constructed, two BamHI sites (underlined) can be designed within the linker, as below:

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySer (SEQ ID NO: 3)

25 GGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCCGGCTCCGGAGGTGGTGGATCC (SEQ ID NO: 4)

Next, the phage library, or genes comprising the variable domains prepared from the phage library (for example, phagemids 30 concentrated from each library by panning and such, or genes amplified by PCR from the above phage library), are treated with BamHI, and self-ligated to reduce the length of the linker from 20 amino acids for scFvs to five amino acids, which is most suitable for diabodies ("GlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO: 6)" encoded by "GGTGGTGGTGGATCC (SEQ 35 ID NO: 5)"). By inserting the resulting V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> fragment comprising anti-receptor antibody into an appropriate expression vector,

diabodies can be screened by using a biological activity as an index. For example, to select agonist diabodies, a diabody library constructed from an antibody library against a cytokine receptor may be inserted into retrovirus vectors, and infected into cells that 5 are able to proliferate in a manner dependent on a desired cytokine.

The scDbs of the present invention are useful in clinical fields for immunodiagnosis, immunotherapy, and diagnosis based on immunoassays, similar to conventionally known multi-specific antibodies. For example, they can be used for a variety of therapeutic 10 purposes such as for inducing cytotoxicity to kill tumor cells, as a vaccination adjuvant, for appropriately delivering drugs such as thrombolytic agents to *in vivo* targets, for ensuring the conversion of enzyme-activated prodrugs at target sites, for treating infectious diseases, for forming immune complexes at cell surface receptors, 15 and for delivering immunotoxins to target cells such as tumor cells.

Pharmaceutical compositions used for such therapeutic purposes, which comprise diabodies of the present invention, may be formulated by mixing with suitable pharmaceutically acceptable carriers and solvents, if necessary, that are inactive against the diabodies. For 20 example, sterilized water, saline, stabilizers, vehicles, antioxidants (e.g. ascorbic acid), buffers (e.g. phosphate, citrate, other organic acids), preservatives, detergents (e.g. PEG, Tween), chelating agents (e.g. EDTA), and binders may be used. Alternatively, they may comprise other low molecular weight polypeptides, proteins 25 such as serum albumin, gelatin and immunoglobulins, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, and lysine, carbohydrates and sugars such as polysaccharides and monosaccharides, and sugar alcohol such as mannitol and sorbitol. When prepared as an aqueous solution for injection, saline and isotonic solutions 30 comprising glucose and other adjunctive agents such as D-sorbitol, D-mannose, D-mannitol, and sodium chloride may be used. In addition, an appropriate solubilizing agent such as alcohol (e.g. ethanol), polyalcohol (e.g. propylene glycol, PEG), and non-ionic detergents (e.g. polysorbate 80, HCO-50) may be used in combination.

35 If necessary, diabodies of the present invention may be encapsulated in microcapsules (microcapsules made of

hydroxycellulose, gelatin, polymethylmethacrylate, and the like), and made into components of colloidal drug delivery systems (liposome, albumin microsphere, microemulsion, nano-particles, and nano-capsules) (refer to, for example, "Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)). Moreover, methods for making sustained-release drugs are known, and these can be applied for the diabodies of the present invention (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12: 98-105 (1982); USP: 3,773,919; EP Patent Application No. 58,481; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP: 133,988).

Administration to patients may be preferably performed by injections or intravenous drips; for example, in addition to intra-arterial injections, intravenous injections, and subcutaneous injections, methods known to one skilled in the art may be used, such as administrating intranasally, intrabronchially, intramuscularly, percutaneously, or orally. Doses may vary depending on various factors, including patient body weight and age, type of disease, symptoms, and administration method, but those skilled in the art are able to appropriately select suitable doses.

In addition, genes encoding diabodies of the present invention may be used for gene therapy by cloning into vectors for such use. Such vectors can be administered by direct injection using naked plasmids, and also by packaging in liposomes, producing as a variety of viral vectors such as retrovirus vectors, adenovirus vectors, vaccinia virus vectors, poxvirus vectors, adenoassociated virus vectors, and HVJ vector (Adolph, "Virus Genome Methods", CRC Press, Florida (1996)), or coating onto carrier beads such as colloidal gold particles (e.g. WO93/17706). However, any method can be used for administration as long as the diabodies are expressed *in vivo* and exercise their function. Preferably, a sufficient dose may be administered by a suitable parenteral route (such as injecting intravenously, intraventricularly, subcutaneously, percutaneously, or into adipose tissues or mammary glands, inhalation, intramuscular injection, infusion, gas-induced particle bombardment (using electron gun and such), or through mucosa such as by nose drops). Alternatively, genes encoding diabodies of the present invention may

be administered into, for example, blood cells bone marrow cells ex vivo using liposome transfection, particle bombardment (USP: 4,945,050), or viral infection, and the cells may be reintroduced into animals.

5 In addition, the diabodies of the present invention may be used for enzyme immunoassays. For this, one of the antibody variable domains of a diabody may be designed to recognize an epitope that does not interfere with the enzymatic activity of the enzyme, and the other arm can be designed to recognize and bind to a carrier that  
10 binds an antibody. For example, diabodies that recognizes IgG, ferritin, HRP, and hormones may be used for such analysis.

In addition, the diabodies of the present invention may be used for *in vivo* and *in vitro* immunodiagnosis of a variety of diseases. For example, one of the antibody variable domains of a diabody can  
15 be designed to recognize an antigen that is specific to tumor cells, and the other arm can be designed to bind a detectable marker. Detectable markers include radioisotopes (e.g.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , and  $^{125}\text{I}$ ), fluorescent dyes (e.g. fluorescein, luciferin), chemiluminescent compounds (e.g. isothiocyanate, rhodamine), and  
20 generally used enzymes such as alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, and HRP. Binding of diabodies to these compounds and detection can be performed according to known methods (Hunter et al., *Nature* 144: 945 (1962); David et al., *Biochemistry* 13: 1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.* 40: 219 (1981); Nygen, *J. Histochem. Cytochem.* 30:  
25 407 (1982)).

Such diabodies of the present invention capable of reacting with detectable compounds can be used in a variety of assays, including competitive binding assays, direct and indirect sandwich immunoassays (e.g. ELISA), and immunoprecipitation assays (Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", 147-158, CRC Press Inc. (1987)).

#### Brief Description of the Drawings

Fig. 1 schematically shows a method for constructing a bispecific scDb library directed against antigens A and B.

35 Fig. 2 schematically shows a method for constructing a diabody library from a phage antibody library.

Industrial Applicability

The present invention provides novel methods for constructing bispecific scDb libraries. By using the methods of this invention, 5 bispecific scDb libraries can be collectively constructed from scFv phage libraries without troublesome procedures. The present invention also provides methods for collectively transferring antibody clones, which have been concentrated from phage antibody libraries by panning and such, to expression vectors used in animal 10 cells.

## CLAIMS

1. A gene encoding two antibody variable domains, wherein the two antibody variable domains are connected by a linker comprising a restriction enzyme site.  
5
2. The gene of claim 1, wherein the linker comprises two or more restriction enzyme sites.
3. The gene of claim 1 or 2, wherein one of the two antibody variable domains is a heavy chain variable domain and the other is a light  
10 chain variable domain.
4. The gene of any one of claims 1 to 3, wherein the two antibody variable domains are connected by a long linker.
5. A gene encoding two antibody variable domains, where both ends comprise a restriction enzyme site.  
15
6. The gene of claim 5, wherein one of the two antibody variable domains is a heavy chain variable domain and the other is a light chain variable domain.
7. The gene of claim 5 or 6, wherein the two nucleotides encoding the two antibody variable domains are connected with a long linker.  
20
8. A gene encoding four antibody variable domains, wherein the gene comprises a restriction enzyme site between the first and second antibody variable domains, and between the third and fourth antibody variable domains.  
25
9. The gene of claim 8, wherein the first and second antibody variable domains are connected with a short linker, the third and fourth domains are connected with a short linker, and the second and third antibody variable domains are connected with a long linker.  
30
10. The gene of claim 8 or 9, wherein the four antibody variable domains are a heavy chain variable domain and a light chain variable domain directed against a first antigen, and a heavy chain variable domain and a light chain variable domain directed against a second antigen.  
35
11. The gene of claim 10, wherein the four antibody variable domains are comprised in the order: a light chain variable domain against the first antigen, a heavy chain variable domain directed against the second antigen, a light chain variable domain against the second

antigen, and a heavy chain variable domain against the first antigen.

12. A method for constructing a gene encoding a bispecific single chain diabody, wherein the method comprises:

- (a) treating the gene of any one of claims 1 to 4 with a restriction enzyme;
- (b) treating the gene of any one of claims 5 to 7 with a restriction enzyme; and
- (c) inserting the gene constructed in step (b) into the gene constructed in step (a).

10 13. A peptide encoded by a gene of any of claims 1 to 11.

14. An antibody library comprising a gene of any of claims 1 to 11.

15 15. A method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

(a) constructing an antibody phage library in which a light chain variable domain and a heavy chain variable domain, both directed against a first antigen, are connected with a long linker comprising a restriction enzyme site;

(b) constructing an antibody phage library in which a light chain variable region and a heavy chain variable domain, both directed against a second antigen, are connected with a long linker at one end, where the other ends comprise a restriction enzyme site;

(c) treating the phage libraries constructed in steps (a) and (b), or genes comprising the variable domains prepared from these phage libraries, with a restriction enzyme; and

20 (d) performing ligation of the fragments obtained from the above treatment to construct a fragment in which the heavy and light chain variable domains against the second antigen are inserted between the light and heavy chain variable domains against the first antigen.

25 16. A method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

(a) treating the gene of any one of claims 1 to 4 with a restriction enzyme;

(b) treating the gene of any one of claims 5 to 7 with a restriction enzyme; and

(c) inserting the gene constructed in step (b) into the gene

constructed in step (a).

17. A method for constructing an antibody library or expression vector, wherein the method comprises:

- (a) constructing an antibody phage library in which a light chain variable domain and a heavy chain variable domain, both against an antigen, are connected with a long linker comprising two or more restriction enzyme sites;
- (b) treating the above phage library, or genes comprising variable domains prepared from the phage library, with a restriction enzyme; and
- (c) performing self-ligation of the fragments obtained above to shorten the linker between the variable domains.

18. An expression vector comprising a gene of any one of claims 1 to 11.

## ABSTRACT

Bispecific diabody libraries can be constructed from scFv libraries efficiently and without troublesome procedures by a single treatment, placing restriction enzyme sites appropriately for antigen-encoding regions.